

⑩ 日本国特許庁 (JP)  
⑫ 公開特許公報 (A)

⑪ 特許出願公開  
昭59—118797

⑬ Int. Cl.<sup>3</sup>  
C 07 H 15/24

識別記号

庁内整理番号  
7252—4C

⑭ 公開 昭和59年(1984) 7月 9日

発明の数 1  
審査請求 未請求

(全 5 頁)

⑮ アントラサイクリノングリコシドの精製法

⑯ 特 願 昭58—241118

⑰ 出 願 昭58(1983)12月22日

優先権主張 ⑱ 1982年12月23日 ⑲ イタリア  
( I T ) ⑳ 24939 A / 82

㉑ 発 明 者 エルネスト・オピーチ  
イタリア国20127ミラノ・ヴィ  
アヴァルトルタ 6

㉒ 発 明 者 カルロ・ヴァレーチヨ  
イタリア国10145トリノ・ヴィ

アシスモンダ 7

㉓ 発 明 者 オノリーノ・ジャコマ・ローサ  
イタリア国10090サンラファエ  
レチメナ / トリノ・ヴィアパウ  
ダーナ 27

㉔ 出 願 人 ファーミタリア・カルロ・エル  
バ・ソシエタ・ペル・アツィオ  
ーニ  
イタリア国ミラノ・ヴィアカル  
ロイムボナチ 24

㉕ 代 理 人 弁理士 山下白

明 細 書

1. 発明の名称 アントラサイクリノングリコシ  
ドの精製法

2. 特許請求の範囲

- 1) 粗生成物の水溶液を樹脂上に選択的に吸着させることにより精製を実施することからなるアントラサイクリノングリコシドの精製法。
- 2) 精製すべき粗生成物を含有する溶液を樹脂上に吸着させる前に pH 3 ~ 5 とすこととなる前記特許請求の範囲第 1 項記載の方法。
- 3) 吸着に使用される樹脂が重合体状イオン交換吸着樹脂およびカルボキシメチルセルロースからなる群から選択されることとなる前記特許請求の範囲第 1 項記載の方法。
- 4) 精製すべき粗生成物を含有する溶液の樹脂への吸着がただ 1 種の型の樹脂を用いることにより、または不純物の性質に応じて異なる

型の樹脂を適宜に選択された順序で用いることにより実施されることとなる前記特許請求の範囲第 1 項記載の方法。

- 5) 粗製された物質を樹脂から脱着することとなる前記特許請求の範囲第 1 項記載の方法。
- 6) 樹脂からの精製された物質の脱着が弱酸性の水、または水と極性溶媒との混合物を用いて溶離することにより実施されることとなる前記特許請求の範囲第 5 項記載の方法。
- 7) 樹脂上への選択的吸着による精製が発酵により得られたアントラサイクリノングリコシドおよび同様の合成化合物のいずれにも使用されうることとなる前記特許請求の範囲第 1 項記載の方法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は樹脂上への選択的吸着によるアントラサイクリノングリコシドの精製法に関する。

前記グリコシドを実質上純粋な形態で取得するのに使用するための高度に特異的な方法を得る必要性は、発酵的製造法および合成的製造法のいずれにおいても粗生成物中における有塩および無機不純物の量が特に高くそして平均12~25%まで達するという事実から主として生ずる。

しかしながら、塩素化された溶媒での粗生成物の抽出そして次に緩衝液での洗浄を行なう従来既知の精製操作による方法では、不純物%が相当低下しているにしてもなお4.5~5.0%の範囲にある最終生成物を生ずる。

一方では一般的に受容しうるものと考えられるが、前記の純度標準は配糖体分子の取扱いおよび化学的試薬に対する特別な感受性を考慮すると、実質上純粋な最終生成物の取得を可能にする改良された精製法の研究における興味を刺

激した。抗腫瘍剤としてのアントラサイクリングリコシドの臨床的使用、そして薬用量および毒性という副次的問題を考慮しつつ、一般的に毒性の高い不純物の最適な除去を達成できることは本発明の明らかな有用性である。

不純物を最高2%の量で含有する最終生成物の取得を可能にする本発明の方法は粗生成物を酸性環境(pH 3~5)で種々のタイプの樹脂上に吸着させそして次に水または水と極性溶媒との混合物を用いて溶離する方法に実質的に基いている。より詳しくは、本発明方法は水溶性物質を溶解含有する弱酸性水性媒体を顆粒またはビードのような粒子中に分散された樹脂上に吸着させる段階および第1の段階において吸着された物質を脱着させる引続く段階を包含するものである。

吸着する樹脂は、実質上一般的に好都合には

#### 4-デメトキシダウノルビシンの精製

力価70.2%および不純物含量1.8%を有する精製状態の4-デメトキシ-ダウノルビン150gを0.5%酢酸ナトリウム溶液3.6L中に溶解させる。酢酸の添加によりpH 4.7としたこの溶液を直径2.5cmのカラム中のアンバーライト(Amberlite®) XAD2型樹脂[ローム・アンド・ハース社製品]400ml上に吸着させる。生成物を水1000mlで洗いそして次に水/メタノール(5:1)(v/v)混合物を用いて溶離する。第1番目の溶出液として、アグリコンおよび種々の不純物を含有する溶液2000mlを集める。

水/メタノール(1:1)(v/v)混合物を用いて溶離を続けそして4500mlのフラクションを集める。溶液状態において溶出液は前記4-デメトキシ-ダウノルビンを10%の不純物と共に含有する。

樹脂粒子を充填した塔またはカラムの形状をした適当な容器中に含有されうる。粗生成物中に含有される不純物の種類の如何により、最初の樹脂からの物質の脱着により得られる溶出液は好都合には引続いて異なる型の樹脂上に吸着され、そこから次に既知方法で溶離されうる。

本発明のクロマトグラフィ精製法においては、重合体状且つイオン交換型またはカルボキシメチルセルロース型の吸着樹脂が使用された。精製すべき粗生成物に応じた種々の型の樹脂の使用における正しい選択および適当な順序そして吸着期間中の弱い酸性環境により、高純度の最終生成物の取得、塩素化有機溶媒使用の排除および優れた精製収率が得られる。

以下の非限定的例により本発明方法を説明する。

例 1

この溶出液を塩酸の添加により pH 2.8 となし、そして次に真空下に濃縮して容量 1500 ml となる。濃縮された溶液に酢酸ナトリウムを添加することにより pH を 4.0 となし、そしてこの弱酸性溶液を直径 2.5 cm のカラム中に含有された CM セフアローズ (Sephacrose®) C1.6B 型樹脂 (ファーマシア社製品) 150 ml 上に流量毎時 150 ml で吸着させる。吸着完了後、カラムを初め水 450 ml でそして次に 0.03 M 塩酸で溶離する。

不純物 1.8 % を含有する初めの溶出液 800 ml を酢酸ナトリウムの添加により pH 4.7 とし、そして第 1 番目の精製段階のアンバーライト XAD2 樹脂上に吸着させるべき粗製 4-デメトキシ-ダウノルビシンの溶液に加えて再循環させる。

純粋な 4-デメトキシ-ダウノルビシンを含有する続く溶出液 (3500 ml) を容量 50 ml となるまで真空濃縮する。アセトン 250 ml を加え、

(v/v) 混合物で溶離する。

溶液中にアグリコンを含有する最初のフラクション (400 ml) を除去し、そして溶離を継続して純粋なダウノルビシンを含有する溶出液 260 ml を集める。希塩酸の添加により pH を 2.5 に調整し、アセトンを添加し、そして生成物を +5°C で 6 時間結晶化せしめる。生成物を濾過し、アセトンで洗い、そして 12 時間真空乾燥する。

出発粗生成物に基いて計算して収率 80 % でダウノルビシンが得られる。HPLC により測定して力価 97 %, 不純物含量 2.6 % である。

### 例 3

#### 4-デメトキシ-ドキシノルビシンの精製

不純物含量 1.4 % を有する 4-デメトキシ-ドキシノルビシン 10.4 g を含有する水溶液 2000 ml を直径 2.5 cm のカラム内に含有される ER180 型樹脂 (ローム・アンド・ハース社製品) 50

得られた沈殿を濾過し、アセトンで洗い、そして乾燥する。出発粗生成物に基いて計算して 52 % の収率で 4-デメトキシ-ダウノルビシンが力価 97 % および不純物含量 3 % 以下で得られる。

### 例 2

#### ダウノルビシンの精製

力価 74.2 % および不純物含量 8.5 % を有する塩素化ダウノルビシン 15.0 g を水 4500 ml 中に溶解させる。酢酸ナトリウムの添加によりこの溶液を pH 5.0 となし、そして直径 2.5 cm のカラム中の S112 カステル (Kastell®) 樹脂またはアンバーライト ER 180 型樹脂 (ローム・アンド・ハース社製品) 400 ml 上に流量毎時 600 ml (1.5 b.v.) で吸着させる。

この生成物を 1 M 塩化ナトリウム溶液 1000 ml で洗い、そして次に水/エタノール (1:1)

ml 上に流量毎時 250 ml で吸着させる。

不純物の選択的吸着により部分的に精製された溶出液を次に CM セフアローズ C1.6B 型樹脂 200 ml 上に吸着させる。生成物をメタノール/水/濃塩酸 (50:50:0.015) の混合物を用いて溶離し、アグリコンおよび他の不純物を含有する最初のフラクション (約 800 ml) を捨てる。次に純粋な物質を含有する溶出液 2000 ml を集め、そして 60 ml となるまで真空濃縮する。アセトン 300 ml を添加し、3 時間攪拌する。沈殿を濾過し、アセトンで洗い、そして乾燥する。不純物含量 3 % の純粋な 4-デメトキシ-ドキシノルビシン 6.5 g が理論上の 58.2 % の収率で得られる。

### 例 4

#### 4'-デスオキシ-ドキシノルビシンの精製

力価 69.2 % として有機不純物含量 1.2 % ならびに鉍物塩不純物 1.2 % を有する 4'-デスオキ

シードキソルビンシン15.0gを水2000ml中に溶解しそしてCMセフアデックスC25型樹脂300ml上に流量毎時600mlで吸着させる。吸着が完了すると、溶液を0.03%塩酸で溶離しそして4'-デスオキシードキソルビンシンを含有するフラクション(65.00ml)を得る。

前記溶出液を水酸化ナトリウム溶液の添加によりpH3.8となし、そしてこれをS112カステル樹脂200ml上に毎時400mlの流量で吸着させる。生成物を水600mlで洗いそして次に塩酸の添加によりpH2.0に酸性化したメタノールで溶離する。

コア溶出液600mlを得、これを真空濃縮して60mlとなす。攪拌しながら、この濃縮した溶液をアセトン600ml中に徐々に加える。形成された沈殿を濾過し、アセトンで洗いそして乾燥する。

mlを集める。

コア溶出液を1500mlまで濃縮し、硫酸ナトリウムの添加によりpH4.8となしそして直径25cmのカラム内に含有されるカルボキシメチルセルロース「ワスマン(Watman®)」樹脂250ml上に毎時500ml(2b.v.)の流量で吸着させる。

吸着が完了すると、生成物をエタノール/水/濃塩酸(99.3:0.7:0.015)混合物で洗いそして次にエタノール/水/濃塩酸(90:10:0.05)の混合物で溶離してコア溶出液3200mlを集める。

溶出液を60mlとなるまで真空濃縮しそしてアセトン300mlの添加により生成物を沈殿させる。

力価9.12%および不純物含量3%を有する4'-エビードキソルビンシン6.9gが得られる。収率55.3%。

力価9.58%および不純物含量4.2%を有する4'-デスオキシードキソルビンシンが理論上の61%の収率で得られる。

#### 例 5

##### 4'-エビードキソルビンシンの精製

力価75.9%および不純物含量15%を有する粗製4'-エビードキソルビンシン15.0gを水4000ml中に溶解させる。

硫酸ナトリウムの添加によりこの溶液をpH4.8となしそして直径2.5cmのカラム内に含有されるアンバーライトIRC724型樹脂400ml上に毎時1600ml(4b.v.)の流量で吸着させる。

カラムを水800mlで洗いそして次にメタノール/水/濃塩酸(95:5:0.015)の混合物を用いて溶離する。まだ10%の不純物を含有する4'-エビードキソルビンシンを含有するコア溶出液4000mlおよび不純物含量の多い後部溶出液1500

#### 例 6

##### ドキソルビンシンの精製

(a) ドキソルビンシン70gを水2.8ℓ中に溶解させる。緩衝液の添加によりpH3.7~4.5となしそしてこの溶液を直径6cmを有するカラム内に含有されるS112カステル樹脂2ℓ上に吸着させる。生成物を水35ℓおよびメタノール15ℓの混合物で溶離する。

溶出液(40ℓ)を0.5ℓとなるまで真空濃縮しそして5℃で3時間攪拌しながらエタノール1ℓおよびアセトン4.5ℓの混合物を添加することにより生成物を結晶化させる。

この生成物を濾過し、0.8ℓのアセトンで洗いそして40℃で5時間真空乾燥する。1回精製されたドキソルビンシン(I)56.0gが得られる。

(b) 前記方法(a)で得られた1回精製ドキソルビンシン(I)80.0gを水2.4ℓ中に溶解させそして緩

衝液の添加により pH 4.0 とす。

この溶液を直径 12 cm を有しそしてカルボキシメチルセルロースワスマン樹脂 1.6 L を含有するカラムに吸着させる。

カラム流出液を除去する。水 3.2 L で洗ったのち、生成物を塩酸の添加により pH 2.5 とした水 5.5 L を用いて溶離する。

溶出液 4.6 L を集めそして真空下に 0.6 L とするまで濃縮しそしてイソプロパノール/アセトン (1:3) 混合物の注意深い添加により生成物を結晶化せしめる。

生成物を篩過し、アセトン 1 L で洗いそして +40℃ で 4 時間乾燥する。力価 98.5% および不純物含量 1.5% を有するドキソルビシン 6.5 g が得られる。